

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-047500
(43)Date of publication of application : 07.03.1986

(51)Int.CI. C07K 15/04
A61K 39/395
C12N 15/00
C12P 21/00
G01N 33/577
//(C12N 15/00
C12R 1:91)
(C12P 21/00
C12R 1:91)

(21)Application number : 59-169370 (71)Applicant : RES DEV CORP OF JAPAN
(22)Date of filing : 15.08.1984 (72)Inventor : TANIGUCHI KATSU
KUROSAWA YOSHIKAZU
SUGITA KOZO

(54) CHIMERA MONOCLONAL ANTIBODY AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

NEW MATERIAL:A chimera monoclonal antibody consisting of a variable region originated from an animal other than human, and a constant region originated from human.

USE: A monoclonal antibody giving low side effects such as anaphylactic shock and serum diseases when administered to human body.

PREPARATION: The objective chimera monoclonal antibody can be produced by separating active VH and VL genes from an antibody-producing cell of an animal other than human and CH and CL genes from human DNA, inserting the genes into a manifestation vector, and introducing the vector to a cultured animal cell.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 昭61-47500

⑬ Int. Cl.

C 07 K 15/04
A 61 K 39/395
C 12 N 15/00
C 12 P 21/00
G 01 N 33/577
((C 12 N 15/00
C 12 R 1:91)
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:91)

識別記号

厅内整理番号

6464-4H
7043-4C
7115-4B
7235-4B
7906-2G

⑭ 公開 昭和61年(1986)3月7日

審査請求・未請求・発明の数 2 (全10頁)

⑮ 発明の名称 キメラモノクローナル抗体及びその製造法

⑯ 特願 昭59-169370

⑰ 出願 昭59(1984)8月15日

⑱ 発明者 谷口 克 千葉市小仲台3-17-12

⑲ 発明者 黒沢 良和 名古屋市昭和区天白町八事富士見丘20-1 ライオンズマ
ンション八事ガーデン2-215

⑳ 発明者 杉田 幸三 名古屋市千種区日岡町1丁目60 相南荘

㉑ 出願人 新技術開発事業団 東京都千代田区永田町2丁目5番2号

㉒ 代理人 弁理士 田中 宏

明細書

1. 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) ヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるキメラモノクローナル抗体
- (2) ヒト以外の動物としてマウスである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (3) ヒト以外の動物としてラットである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (4) ヒト以外の動物の抗体产生細胞から単離した活性な γ_H と γ_L 遺伝子及びヒトDNAから単離した α_H と α_L 遺伝子を発現ベクターに挿入し、動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を生産することを特徴とするヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域とからなるキメラモノクローナル抗体の製造

方法

- (5) 抗体產生細胞としてハイブリドーマ、エピステミンペールヴィルスによる形質転換B細胞またはクローニングB細胞を用いる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (6) ベクターとしてpSV2-gpt,pSV2-neo,SV40からなる群から選ばれたベクターを使用することからなる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (7) 動物培養細胞がヒト、サル、マウス等の動物に由来するリンパ腫、腎細胞、L細胞、CoS細胞、HeLa細胞の何れか一種を使用する特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法

3. 発明の詳細な説明

本発明はキメラモノクローナル抗体及びその製造法に関するもので、特に人体に投与した場合にアナフィラキシーやショックや血清病などの副作用の少ないモノクローナル抗体及びその製造法に関するものである。

单一抗原決定基だけを認識するモノクローナル抗体は免疫学全般に大きな影響を与える。その有用性は医学界でとくしまらず生物学、薬学、化学などの多くの分野で証明されている。そして、このモノクローナル抗体を得る方法に関しては1975年KöhlerとMilsteinがヒツジ赤血球で免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞とを細胞融合させることで実現し(*Nature* 256 495-497 (1975))、この外エプスタイン-ペール(Epstein-Barr)ウイルスによる方法などがある(特願昭58-201723号参照)。しかして、これらのモノクローナル抗体の多くはそれ自体がマウス等人間以外の動物由来するためそれを人間に投与した場合には異種蛋白を注射することになり、その結果、アナフィラキシーショックや血清病などの副作用がおこることが予想される。そのため、ヒトハイブリドーマを用いてヒトモノクローナル抗体を作成する試みがなされている。

(例えば特願昭57-126424、特願昭57-502090、特願昭68-90517、特願昭

55-584-5128323及び特願昭57-50209号参照)これらによればヒト型のモノクローナル抗体を得ることは可能であるが必ずしも再現性等の点において満足すべきものとは云えない。(Nature 300 316-317 (1982) 参照)

また、マウス等の動物は容易に種々の抗原で免疫することは可能であるが人間については血中の抗原を用いて自由に免疫できないという欠点がある。一方、ヒト型モノクローナル抗体を產生するヒトXマウスハイブリドーマを作製してμ鎖特異的mRNAを得たのち相補鎖DNAを作製し、プラスミドpBR322に組み込んで大腸菌にヒトモノクローナル抗体を产生させる試みを行つてあるがこの方法も人間には自由に免疫できないという点で問題がある。

本発明者はこれらの欠点を改善すべく種々の研究を行い本発明を完成するに至つたのである。すなわち本発明はヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるキメラモノクローナル抗体であつて、これの製造方法はヒト以外の動

-3-

-4-

物の抗体産生細胞から単離した活性なV_HとV_L遺伝子及びヒトDNAから単離したD_HとD_L遺伝子を発現ベクターに挿入し動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を產生させることからなる。ここで「活性なV_HとV_L遺伝子」とは抗体産生細胞においてDNAの再配列によって出来たV_HにあつてはV-D-J、V_LにあつてはV-J構造を有する機能的な遺伝子である。しかし、本発明においてヒト以外の動物としてはマウス、ラット、サル、羊、ウサギ等であり、また、抗体産生細胞としては好ましくはハイブリドーマ、クローン化B細胞或はエプスタインペールウイルスによる形質転換B細胞を用いることが最もしく、発現ベクターとしてはpSV2-gpt、pSV2-neo、SV40が好適である。動物培養細胞には、ヒト、サル、マウス等の動物由来するリンパ腫、腎細胞、L細胞、C68細胞、HeLa細胞の何れかを用いることができる。

しかし、本発明に従えばヒト以外の動物は自由に免疫できるので容易に所望のキメラモノクローナル抗体を得ることができると共に、人間に投

与した場合動物由来のモノクローナル抗体に比して異種蛋白による抗原性が著しく軽減されることが期待される。

次に実施例をもつて本発明を説明する。

実施例

マウスV遺伝子の単離

腫瘍細胞P3U1とO57BL/6マウスに自然発生した黑色腫瘍細胞で免疫したO57BL/6マウスに由来する脾臓細胞との融合細胞であるハイブリドーマD10株(注、正式にはM2590株である。)は黑色腫瘍細胞と選択的に反応する抗体を分泌し、この抗体のタイプはH鎖についてはIgM型で、L鎖についてはIgEである。先づD10株、P3U1株及びO57BL/6マウス腎臓からDNAを単離す(DNA 24 353-356 (1981) 参照)次に10μgのDNAを制限酵素HindIIIとBcoBIで切断する。制限酵素のHindIIIで切断したD10株とP3U1株及びO57BL/6マウス腎臓のDNAを電気泳動で0.9%のアガロースゲルに展開しニトロセルロース膜(Schleicher and Schuell, J. Mol. Biol. 98 503

~515 (1975) 参照) に転写し、一方 DNA 断片を含んだ 2.7 Kb HindIII-HindIII 断片に相当する (利根川進氏より得た。Nature 280 288~294 (1979) 参照) J_α プローブ (10⁷ cpm/0.1 μg DNA) を用いたハイブリダイゼーションを行つた。その結果を図 1 A (a) に示す。

ところで図 1 A (a) より明らかかのように D10 株の DNA は 6.5, 6.8 及び 6.1 Kb の 3 つの再配列したバンドが存在する。これらのうち 6.8 及び 6.1 Kb は P3U1DNAK 見られるものと同様のものである。6.5 Kb のバンドは V_α-J_α 構造を含む活性を遺伝子であり、その特異性の発現に関与する遺伝子である。分子サイズはメフアージの HindIII マーカーによつて見積つた。このサイズに相当する DNA 断片をアガロース電気泳動により単離し、メフアージ HindIII ベクター λ 788 (K. Murray 氏 (エジンバラ大学) より得た。Mole. Gen. Genet.; 150 58-61 (1977) 参照) に挿入し、メフアージにバックケージした。バックケージミクスチャーには大腸菌 BHB 2688 と BHB 2690 を用いた。(Hahn.)

-7-

クローン VJ_α 1.4 は機能的な V_α-J_α 構造を含んでいる。

ノーザンハイブリダイゼーションの方法は免疫実験操作法 XII (1983) に記載されている。

また、図 1 A (c) は 0.8 Kb の XbaI-EcoRI 断片に相当する J_H プローブ (Cell 24 353-365 (1981) 参照) と EcoRI で切断した DNA のサンハイブリダイゼーションを示す。先に述べた理由を基に D10 株 DNA にだけ検索される 5.5 Kb の DNA を機能的な H 鎮の V 鎮遺伝子を含む断片メフアージ EcoRI ベクターである λgtWES-λB (P. Leder. Science 196 175-177 (1977) 参照) を用いてクローン化し、クローン VJ_H 2.4.3 を得た。クローン VJ_H 2.4.3 と MEP 203 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77 2138-2142 (1980) 参照) の 1.0 Kb の EcoRI 断片に相当する O_H プローブを用いた。D10 株の mRNA とノーザンプロットを行つた結果、2.4 Kb の位置にバンドを見つけた (図 1 A (d) 参照)。クローン VJ_α 1.4 と VJ_H 2.4.3 に含まれる

B. Meth. Enzymol. 68 299-309 (1979) 参照) 次に J_α プローブをスクリーニングに用いベントンハイビス法 (Science 196 180-182 (1977) 参照) にしたがつてブラークハイブリダイゼーションを行いクローン VJ_α 1.4 を単離した。このクローンの制限酵素地図を表 I B (d) に示す。このクローン VJ_α 1.4 の Hind III 挿入断片をノーザンハイブリダイゼーションを行うために単離した。

D10 株からグアニジニウムチオシアンート法 (Biochemistry 18 5294-5299 (1979) 参照) により全 RNA を分離し、オリゴ dT セルロースカラムの素通り部分から poly A 構造をもつ mRNA を得た。図 1 A (b) は D10 株の mRNA と、クローン VJ_α 1.4 の HindIII 挿入断片或は O_H 領域を含む 3 Kb HindIII-BamHI 断片 (利根川進氏より得た。Nature 280 288-294 (1979) 参照) に相当する O_H プローブとのノーザンハイブリダイゼーションを示している。J_α と O_H の両プローブにより 1.2 Kb の位置にバンドが見つかつた。

-B-

れる活性を V 遺伝子が特異性の発現に関与する。

ヒト O 遺伝子の単離

ヒトの血漿の中で主要な免疫グロブリンクラスターである IgG の定常領域の遺伝子を単離する。すなわちヒトの免疫グロブリン遺伝子の塩基配列はマウスのそれと高い相同意を示しているので、ヒトのゲノムに存在する例えば O_H と O_{T1} 遺伝子をそれに相当するマウスの遺伝子をプローブとして用いて単離するのも一つ、その方法はクローン Ig146 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 4709-4713 (1978) 参照) からの 3 Kb の Hind III-BamHI 断片とクローン MEP 1.0 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 474-478 (1981) 参照) からの 5.8 Kb の EcoRI 断片をプローブとして用いヒトのラムダ charon 4A の HaeIII-AluI 遺伝子ライブリリー (T. Maniatis, Cell. 15 215 7-1174 (1978) 参照) 中からヒト O_H 遺伝子を含みエンハンサー領域を保持している断片を単離する。O_{T1} 遺伝子はヒト胎子単細胞 DNA を HindIII で切断しアガロースグル電気泳動で大き

-9-

さにしたがつて分画したのち 5.9 Kb のバンドを 1788 に挿入し前記のプローブを用いてクローニ化した。单離したクローンは図 1B(c) の λ HO₅Z と (d) の HG163 である。

λ (マウス) 遺伝子と λ (ヒト) 遺伝子を含むプラスミド pSV2-HG₅V_{D10} 作成

エンハンサーを保持し本ヒト λ 遺伝子を含む 1.8 Kb の λ V_{D10} II 断片を図 1B(c) に示すクローン HO₅Z から单離し等量混合した Hind III と BamH I リンカーカー（宝酒造酵母）を結合したのち Hind III で切断する。この断片を図 1B(d) に示す λ V_{D14} から单離した 6.5 Kb の Hind III 挿入断片と結合し、BamH I で切断する。得られた断片を分別してアガロースゲル電気泳動に上り 5.9 Kb の断片を单離する。この断片を pSV2gpt の BamH I 部位に挿入する。挿入した遺伝子の方向は、制限地図により決定する。（図 2, pSV2-HG₅V_{D10} 参照）。

λ (マウス) 遺伝子と λ (ヒト) 遺伝子を含むプラスミド pSV2-HG1V_{D10} 作成

8.2 Kb の Hind III 挿入断片を HG163 クローン

-11-

2. 室温で 30 分間保温する。
3. P3U1 株をトリプシン処理し、細胞をばらばらにした後 10 % 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地を加えトリプシン処理を終了させる。
4. 培養液を 1,500 rpm 5 分間遠心して細胞を集める。
5. 牛胎児血清を含まない培地に 2×10^7 個の細胞を滴下する。
6. 1,500 rpm で 5 分間遠心する。
7. 直接、1 の液 10 mL に浮遊する。
8. 37°C で 30 分間保温する。
9. 5 mL を別の試験管に移す。
10. 10 % 牛胎児血清を含む RPMI 1640 の培地をそれぞれ 4.5 mL ずつ加える。
11. 96 穴プレートにそれぞれ 0.1 mL ずつ 2×10^4 個の細胞が入る様に分注する。
12. 72 時間 RPMI 1640 - 10 % 牛胎児血清培地で培養する。
13. その後 5 μ g/mL のミコフエノール液と

から单離し、Klenow 酶により両端の一本鎖部分を消化し、その両端に EcoRI リンカーカー（宝酒造酵母）を接続した。その断片を EcoRI と BamHI で切断し EcoRI と BamHI で開環したプラスミド pSV2gpt に挿入し、ヒト λ 遺伝子を含む pSV2-HG14 クローンを得る。5.5 Kb の EcoRI 断片をクローン λ V_H 243 から单離し pSV2-HG14 の EcoRI 切断位置に挿入する。挿入した遺伝子の方向に制限地図により決定した。（図 2 b, pSV2-HGIV_{D10} 参照）。

プラスミド pSV2-HG₅V_{D10} 及び pSV2-HG1V_{D10} による形質細胞腫の形質転換

pSV2-HG₅V_{D10} と pSV2-HG1V_{D10} の両 DNA をカルシウム、リン酸共沈降法（proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 1373-1376 (1979 参照)）によりプラスミダサイトーマ（形質細胞腫） P3U1 株（H 細胞は合成しないが L 細胞を生成する性質を持つ）に導入した。その方法は次のとおりである。

1. A 液をそれと等量の 2xHeBS 液液に滴下する。

-12-

RP
250 μ g/mL のキサンテンを含む RPMI 1640
- 10 % 牛胎児血清培地にとりかえ、形質転換した細胞を選択する。

しかして、A 液液及び 2xHeBS 液液は次のよう

な組成を有する。

A 液液

pSV2-HG1V _{D10}	1140 μ L	(プラスミド 200) (λ 含有)
pSV2-HG ₅ V _{D10} <i>cut</i>	600 μ L	()
2M CaCl_2	312.5 μ L	(オートクレーブ) で滅菌したもの
再蒸留水	2647 μ L	
2xHeBS 液液	pH 7.0	
HEPES	10 mM	
NaCl	16 g/L	
KCl	0.74 g/L	
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	0.25 g/L	
dextrose	2 g/L	

キメラモノクローナル抗体産生形質転換細胞の選別

-13-

-1154-

-14-

キメラモノクローナル抗体産生形質転換細胞の選別には酵素免疫、蛍光抗体法、或はセルソーター-(FACS) (ベクター・テクニクン社)による解析を用いた。ミコフェノール酸を含む選択培地により18の形質転換細胞クローンが選別された。PSU1株とこれら18の形質転換細胞はプレート中に十分増殖するまで選択培地で育てた。これらの細胞の培養上清を酵素免疫蛍光抗体法 (Meth. Enzymol. 70 419-429 (1980) 参照)によつて抗体の產生状態を試験した。その結果を表1に示す。

表 1

抗体 細胞	ウサギ抗ヒト IgGc	ウサギ抗ヒト Cx抗体
HMH-S1	-	-
HMH-S6	-	-
HMH-S7	+	+
HMH-S8	-	-
HMH-S18	-	-

-15-

最後に 1×10^6 個の細胞を 1 ml の培養液に浮遊させ、対数増幅器付きの FA08 N (ベクター・ディクソン社)で解析した。その結果を図3に示す。図3(a), (b), (c)は陰的細胞としてHMH細胞を用いたウサギ IgGの反応をコントロールとし、それぞれ(a)はウサギの抗ヒト Ig抗体、(b)はウサギの抗ヒト Cx抗体、(c)はウサギの抗ヒト IgGc抗体との反応を表わし、(d), (e), (f)はHMH細胞とPSU1細胞に対するそれぞれ(d)はウサギの抗ヒト Ig抗体、(e)はウサギの抗ヒト Cx抗体、(f)はウサギの抗ヒト IgGc抗体の反応を表わす。

HMH細胞に導入されたDNAの解析

HMH細胞から前述の方法によりDNAとポリA構造を含むRNAを単離する。HMH細胞のDNAと同様に単離したO57BL/6腎臓細胞とPSU1細胞のDNAをBamHIで切断しJ_κ(マウス)プローブ(表4 A-(a)), O_x(ヒト)プローブ(表4 A-(b)), J_H(マウス)プローブ(表4 A-(c))及びO_T(ヒト)プローブ(表4 A-(d))を用いサンハイブリダイゼーションを行つた。

HMH-S7は 1×10^6 個の細胞が 1 ml の培養上清に約 $100 \text{ mU}/\text{ml}$ のマウス・ヒトキメラモノクローナル抗体を産生している。

抗ヒト IgGを用いたHMH細胞とPSU1のセルソーターパーク

HMH細胞とPSU1株は Hank's の平衡塩類溶液 (Gibco) で 2 度洗浄し、 10^6 個の細胞を $750 \mu\text{l}$ の染色液(1% FCS-RPMI 1640)と $250 \mu\text{l}$ のウサギ抗ヒト免疫グロブリン抗体又は正常ウサギ IgG ($1 \text{ mg}/\text{ml}$)の混合液に浮遊させ、1時間室温で保溫した。その後細胞を 3 度洗浄した。その後の手順はベクターラボラトリ社のアビジンビオテンキット (avidin-biotin-biotin) に示されているものと同様である。要領としては細胞を予めヒト IgGで吸収処理したビオチン結合抗ウサギ IgG ($1.5 \text{ mg}/\text{ml}$) 200倍希釈液 $250 \mu\text{l}$ に浮遊し、1時間、室温で保溫した後、Hank's 液液で 3 度洗浄し、 $250 \mu\text{l}$ の 20 倍希釈アビジン FITC ($5 \text{ mg}/\text{ml}$) を浮遊させ室温で 30 分間保溫し、Hank's 液液で 3 度洗浄する。

-15-

ヒト O_xとマウスJ_κプローブは pSV2-HGIVD₁₀ の BamHI挿入断片のサイズに相当する 5.9 Kb のバンドを H MH 細胞の DNA 中に探索した。マウスJ_Hプローブは pSV2-HGIVD₁₀ の V_H 遺伝子を含む EcoRI挿入断片に相当する 5.5 Kb のバンドを H MH 細胞の DNA 中に探索した。ヒト O_T1 プローブは pSV2-HG1VD₁₀ の O_T 遺伝子を含む EcoRI-BamHI挿入断片を H MH 細胞の DNA 中に探索した。これらにより H MH 細胞にはゲノム中に完全な H 鎮と L 鎮のキメラ遺伝子を保持していることが示された。

H MH 細胞より単離したポリA構造をもつ mRNAとPSU1より単離したポリA構造をもつ mRNAをそれぞれVJ_κ14プローブ、ヒト O_xプローブ、VJ_H243プローブ及びヒト O_T1プローブとの間でノーザンプロットを行つた。VJ_κ14プローブとヒト O_xプローブにより通常 K 鎮を生成している細胞にみられるのと同じサイズに相当する 1.2 Kb のバンドがキメラ抗体の L 鎮の mRNAとして探索され、H MH 細胞の mRNA中に

最初に転写されたもので、またスプライシングされていないためイントロンがとり除かれていらない mRNAが 5 Kb のバンドとして探索される。(図 4 B (a) 参照) VJH2 4 3 として OrI プローブにより H M H 細胞の mRNA 中に 3.5Kb と 7Kb のバンドが探索され、3.5Kb のバンドは真結合型の Y H 線の mRNA のサイズに相当し、7Kb のバンドは最初に転写されたイントロンがとり除かれていらない mRNA に相当する。

以上により H M H 細胞中でマウス由来の Y-DNA エクソンとヒト由来 Y-DNA エクソンの間で最初に転写された mRNA のスプライシングが部分的に起つていることが証明された。

4. 図面の簡単な説明

図 1 A は活性なマウス V 遺伝子とヒトの D 遺伝子を単離するためのサンプルハイブリダイゼーション及びそれらの mRNA のノーザンプロットテングの解析結果を示す X 複写真

B は単離したクローンの制限酵素地図

図中 E はエンハンサー、 H は Hind III

「：B は Bam HI、E は Eco RI、P は Pvu II を表わす。
図 2 は DNA 形質転換に用いるために作成した
プラスミド構造

a) プラスミド pSV2-HGIVD1 の構造

b) プラスミド pSV2-HGIVD1 の構造

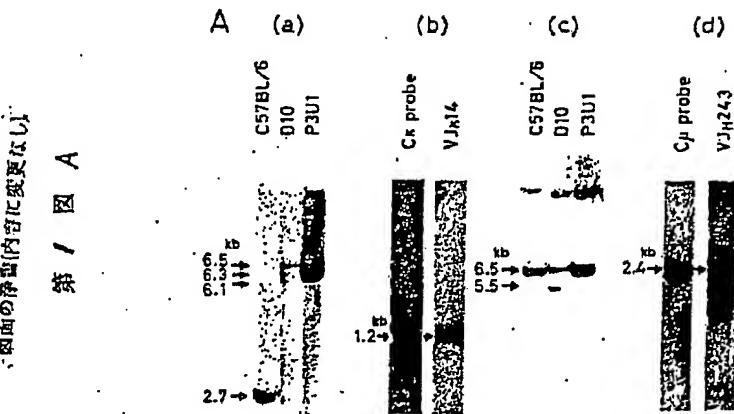
図 3 はセルソーター解析図

図 4 A は H M H 細胞の DNA のサンプルハイブリ
ダイゼーション

B は H M H 細胞の mRNA のノーザンプロット
テング解析結果を示す X 複写真

出 品 人 新技術開発事業団

代 表 人 田 中 宏



、裏面の添字内音に変更なし。

第 1 図 A

國
無

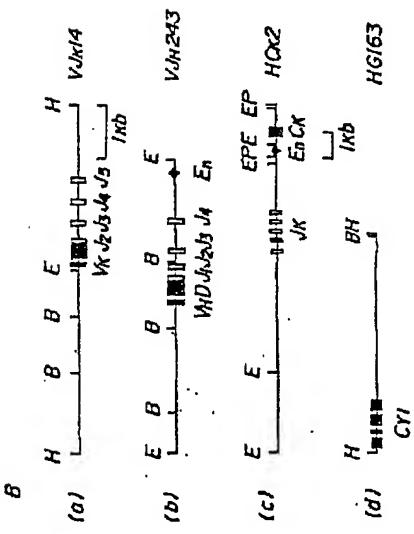
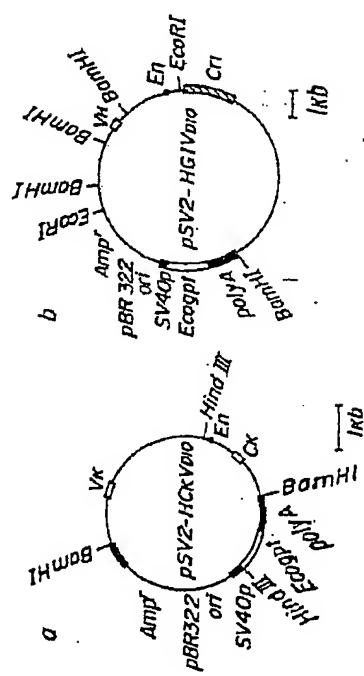
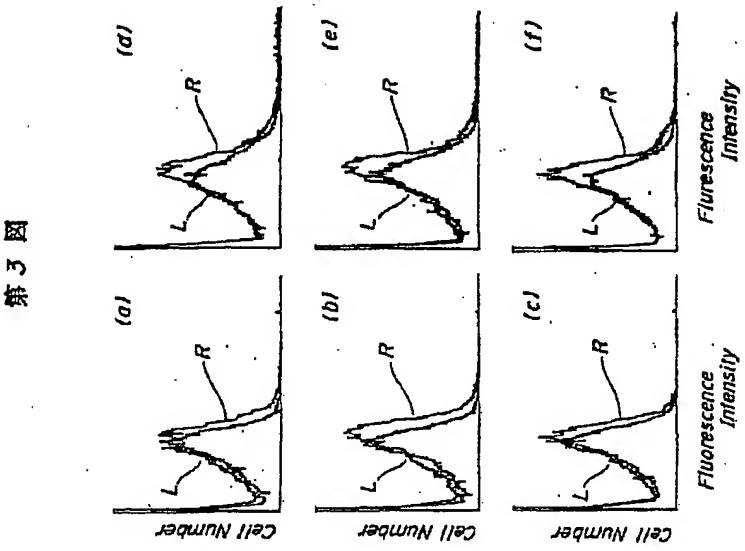


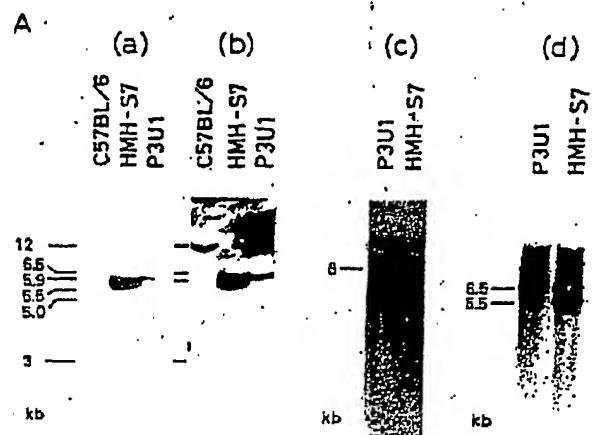
圖 2



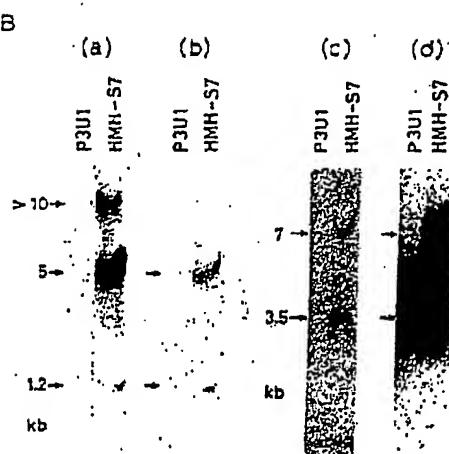
B 図 1 / 第



第4 図 A



第4 図 B



手続補正書

昭和59年9月27日

特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和59年特許願第169370号

2. 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都千代田区永田町二丁目5番2号

名称 新技術開発事業団

理事長 久良知 篤 善

4. 代理人 〒105

住所 東京都港区虎ノ門二丁目5番5号

ニュー虎ノ門ビル5階(電話03-501-1820)
氏名 8940弁理士 田中 宏

手続補正書

昭和59年10月31日

特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和59年特許願第169370号

2. 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都千代田区永田町二丁目5番2号

名称 新技術開発事業団

理事長 久良知 篤 善

4. 代理人 〒105

住所 東京都港区虎ノ門二丁目5番5号

ニュー虎ノ門ビル5階(電話03-501-1820)
氏名 8940弁理士 田中 宏

5. 補正命令の日付 自発補正

6. 補正により増加する発明の数 なし

7. 補正の対象 図面

8. 補正の内容

図面の書き方(内容に変更なし)

5. 補正命令の日付 自発補正

6. 補正により増加する発明の数 なし

7. 補正の対象

明細書、特許請求の範囲及び発明の詳細を説明の概要

8. 補正の内容

1. 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

2. 明細書3頁6行目「Milstein」を「Milstein」と補正する。

3. 同頁9行～10行目「ペール」を「パール」と補正する。

4. 同5頁16行目「OoS」を「OOS」と補正する。

5. 同10頁16行目「T. Manistein」を「T. Manistein」と補正する。

6. 同書同頁19行目「胎子早細胞」を「胎兒肝細胞」と補正する。

7. 同書11頁6行目「プラスミド」を「プラスミド」と補正する。

8. 同書同頁14行～15行目「断片を導入する」を「断片を導入する」と補正する。

9. 同書12頁9行目「向に制限」を「向は制限」と補正する。

10. 同書15頁2行目「酵素免疫、蛍光抗体法」を「酵素免疫蛍光抗体法」と補正する。

11. 同書16頁8行目「FOS-RPMI10 11 640」

以上

を「FOS-RPMI 1640」と補正する。

12. 同書20頁1行目「PはpvuII」を「Pは

PvuII」と補正する。

(別紙)

「特許請求の範囲

- (1) ヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるキメラモノクローナル抗体
- (2) ヒト以外の動物としてマウスである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (3) ヒト以外の動物としてラットである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (4) ヒト以外の動物の抗体産生細胞から単離した活性な V_H と V_L 遺伝子及びヒトDNAから単離した D_H と D_L 遺伝子を発現ベクターに挿入し、動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を生産することを特徴とするヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域とからなるキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (5) 抗体産生細胞としてハイブリドーマ、エピ

スタインペールウイルスによる形質転換B細胞またはクローン化B細胞を用いる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法

- (6) ベクターとしてpSV2-gpt, pSV2-neo, SV40からなる群から選ばれたベクターを使用することからなる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (7) 動物培養細胞がヒト、サル、マウス等の動物に由来するリンパ腫、腎細胞、L細胞、OOB細胞、HeLa細胞の何れか一種を使用する特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法